

## 人為刺激に伴う魚類白血球の アラキドン酸カスケード代謝産物

吉田美夫<sup>\*1</sup>・沖増英治・武田州弘・雨村明倫

福山大学内海生物資源研究所

Oxygenated Derivatives of Arachidonic Acid from Leukocytes of Various Fishes after Artificial Challenge.

Yoshio Yoshida<sup>\*1</sup>, Eiji Okimasu, Kunihiro Takeda and Akinori Amemura

(Research Institute of Marine Bioresources, Fukuyama University, Ohama-cho, Inno-shima, Hiroshima 722-21, Japan)

Report Res. Inst. Marine Bioresources, Fukuyama Univ., No. 4, 13-22 (1993).

High-performance liquid chromatographic analysis of the supernatant from peripheral leukocytes of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) challenged with calcium ionophore A23187 revealed the presence of lipoxygenase products including monohydroxy fatty acids, leukotrienes, lipoxins and some other undetermined substances distinguished by retention times and UV spectra characteristic. Of the sea-water fishes examined, the peripheral leukocytes, the cells isolated from haemopoietic head kidney and the peritoneal exudate cells did not generate lipoxins. In the artificial challenge of flounder (Paralichthys olivaceus) by i.p. injection with Edwardsiella tarda, the lipoxins were not generated from peripheral leukocyte. These variations in lipoxin generation suggest that there are differences in the mode(s) of biosynthesis of these compounds between the species of fish or the stimuli.

生体内に異物が侵入すると、異物を排除するために白血球が働く。このとき白血球は刺激に応答

---

<sup>\*1</sup> 現住所： 共立商事 (株) 中央研究所 〒300-12 茨城県稲敷郡荃崎町高見原2-9-22

して、さまざまな生理活性物質を産生する。白血球が産生する生理活性物質の一つとして遊離アラキドン酸 ( $C_{20:4}$ ) を前駆体として生合成されるエイコサノイドがある。アラキドン酸は通常リン脂質のグリセロール骨格の2位にエステル結合しているが、細胞膜に対する種々の刺激により、ホスホリパーゼ $A_2$ が活性化され、リン脂質よりアラキドン酸が切り出されて遊離型脂肪酸となる。この遊離アラキドン酸がシクロオキシゲナーゼやリポキシゲナーゼの基質となり、前者ではプロスタグランジン (PG) あるいはトロンボキサン (TX) へ、後者ではロイコトリエン (LT) あるいはリポキシシン (LX) へと代謝される。

異性体を多くもつ LXsはその免疫応答において立体特異的に作用するため、LXsは他のエイコサノイドと区別されて考えられている<sup>1)</sup>。LXsの紫外吸収スペクトルの特徴は共役テトラエン構造により、287 nm, 301 nm, 315 nm付近に極大値をもち、301 nmに最大値をもつ三峰性である<sup>2)</sup>。このLXsは、アラキドン酸が15-リポキシゲナーゼ酵素により15-HPETEへ変換され、更に5-リポキシゲナーゼや12-リポキシゲナーゼの作用により生成される。

LXsはヒト白血球で産生されるが<sup>3-5)</sup> 特に15-リポキシゲナーゼを多量に含む好酸球で多く産生され、事実、好酸球増加症患者の末梢白血球ではLXs生成量が増大している<sup>6)</sup>。また、ヒト血小板においてもLXsが産生されることが報告されている<sup>7)</sup>。ヒト以外の哺乳類ではブタ白血球<sup>8)</sup>、ウシ白血球<sup>9)</sup>、ラット肺胞マクロファージ<sup>10)</sup>、ラット好塩基性白血病細胞 (RBL-1)<sup>11)</sup>、ラット腎臓メサンジウム細胞<sup>12)</sup> などでLXsの産生がみられる。これらの細胞は刺激物に対して単独でLXsを産生するが、ヒト顆粒球-好酸球<sup>13)</sup>、ヒト血小板-顆粒球<sup>7)</sup>、ヒト好中球-血小板<sup>14)</sup> などのように細胞間同士の相互作用によりLXsを産生するものがある。しかし、魚類ではニジマスの白血球、特にマクロファージが $Ca^{2+}$ イオノフォアA23187の刺激により主にLXsを産生することが報告されている<sup>6)</sup> にすぎない。また、魚類では細菌感染による白血球の動態は調べられているが、白血球が産生するケミカルメディエーターについての知見はあまり見受けられない。

ニジマスのマクロファージは $Ca^{2+}$ イオノフォアA23187の刺激により、他のエイコサノイドと比較して多量のLXsを産生することが報告されている。<sup>2)</sup> 一方、ヒトにおいては主に好酸球で認められ、その活性は低く、産生される量も極めて少ないと報告されている<sup>13)</sup>。このことから、LXsは魚類において重要な役割を果たしているものと考えられる。

本研究はニジマス (*Oncorhynchus mykiss*)、タイ (*Pagrus major*)、ブリ (*Seriola quinqueradiata*)、ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) を用いて、ニジマス以外の魚種の白血球にも $Ca^{2+}$ イオノフォアA23187の刺激によりLXsが検出されるか否かを腎臓、全血、腹腔浸出細胞由来の種類の異なる白血球を用いて調べた。また、ヒラメに魚病細菌の *Edwardsiella tarda* を腹腔内注射した後、経時的に血中白血球の動態を調べ、白血球を $Ca^{2+}$ イオノフォアA23187で刺激し、LXsが産生されるか否かを検討し、魚病細菌感染による魚体内での白血球の動態ならびにLXsの関与について考察した。

## 材料および方法

### 供試菌株

1990 年 10 月に広島県因島市の養殖場で感染したヒラメ病魚の腎臓から分離した *Edwardsiella tarda* FM9010 株を用いた。25℃, 48時間の平板寒天培地培養した後, 生じたコロニー数を数えて  $4.5 \times 10^3$  CFU/mlの濃度に調製した。

### 供試魚

ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) は福山大学で飼育した体長20.0 ~ 24.0 cm, 体重130.0 ~ 180.0 g のものを用いた。マダイ (*Pagrus major*) は福山大学で飼育した体長14.0 ~ 16.0 cm 体重75.0 ~ 95.0 g のものを用いた。ブリ (*Seriola quinqueradiata*) は愛媛県の養殖業者から購入した体長 48.0~56.0 cm, 体重 1.5~1.6 kg のものを用いた。ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) は広島県の養殖業者から購入した体長22.0 ~ 25.0 cm, 体重165.0 ~ 220.0 g のものを用いた。

### 腹腔内浸出細胞の採取方法

MS222 で麻酔をかけた後, 滅菌した10%カゼイン溶液をブリに 20 ml, その他の魚種には2 mlを腹腔内に接種した。2日後, L-15培地を腹腔内に注入し腹部をマッサージした後, 切開して腹腔内のL-15培地を回収し, 遠心操作により白血球を洗浄した。0.5%トリパンブルー溶液で生死判別を行い, 血球計算盤で白血球数をカウントした。

### リポキシンの検出方法

腎臓, 末梢血, 腹腔浸出液から分離した白血球浮遊液に40  $\mu$ M  $\text{Ca}^{2+}$ イオノフォアA23187を加えてニジマスでは15℃, 30分間, その他の魚種では25℃, 30分間反応させたのち, 25℃, 10,000 x gで5分間遠心分離を行い上清を回収した。これにエタノールを加えて最終エタノール濃度が15%になるように調整し, 25℃, 10,000 x gで5分間の遠心操作によりエタノール抽出を行った。回収された上清は 1N HClでpH 3.5~4.0に調節した。SEP-PAK  $\text{C}_{18}$  カートリッジカラムを5 mlのエタノールで洗い, 蒸留水で平衡化したのち試料を注入し, 20 ml の蒸留水を通して, 極性の高いタンパク質及びリン脂質の一部を除去した。そして, 吸着したアラキドン酸代謝産物を 15 mlの酢酸エチルで溶出した。上層の酢酸エチル層を回収し, 窒素気流下で乾固させた。これに水/メタノール/アセトニトリル/酢酸:45/30/25/0.05 (溶媒 A) 100  $\mu$ lを加えて, 超音波にかけ, 0.45  $\mu$ mのミリポアフィルターで濾過し試料とした。

試料20  $\mu$ lをODS-80TMカラムを用いた高速液体クロマトグラフィー分析にかけた。溶出液は溶媒 A とメタノール (溶媒 B) を用い, 分析カラムを溶媒 Aで平衡化させて, 試料注入後から40分で溶媒 Bになるように直線濃度勾配で溶出した。流速は 0.6 ml/minで, 302 nm, 270 nm, 235 nmのクロマトグラムをそれぞれ調べた。

#### ヒラメ腹腔内注射感染による血中白血球の動態

$4.5 \times 10^3$  CFU/mlに調製した*Edwardsiella tarda* FM9010株を1 ml腹腔内に接種し、経時的（0, 1, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 h）に血中白血球がどのように変動するかをギムザ染色による塗末標本を作製し、赤血球に対する白血球の割合で調べた。また、腹腔内に細菌を接種したヒラメの全血を経時的（0, 1, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 h）にサンプリングし、 $40 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ イオノフォアA23187で刺激して、LXsの検出を試みた。

### 結 果

#### 1. 各魚種の白血球によるリポキシン産生能

Fig.1 より、 $\text{LXA}_4$ の標準物質を302, 270, 210 nmの各波長において流速0.6 ml/minでODS-80TMカラムにかけると、 $\text{LXA}_4$ は30分頃に検出されるが、そのクロマトグラムは、302, 270, 210 nmの波長により異なり、低波長になるほどそのピークが減少することが認められた。また、 $\text{LXB}_4$ は24分頃にピークが現れ、 $\text{LXA}_4$ と同様の吸光特性を示した。これら LXsの特徴を利用して各魚種の白血球による LXs産生能を検討した。Fig.2より、ニジマスの末梢血から分離した白血球を $\text{Ca}^{2+}$ イオノフォアで刺激した場合、25分後にピークが現れ、302, 270, 210 nmと波長を変えるとそれに応じて、ピークが減少することが認められた。一方、 $\text{Ca}^{2+}$ イオノフォアで刺激しなかった場合には Fig.7が示す通り、LXsの特徴を示すピークは検出されなかった。このことからニジマス末梢血から分離した白血球は $\text{Ca}^{2+}$ イオノフォアの刺激により LXs産生を行うことが判明した。

ヒラメでは Fig.4が示す通り、 $\text{Ca}^{2+}$ イオノフォアの刺激にかかわらず、LXsは検出されなかった。ブリ、マダイにおいても Fig.3, Fig.5が示す通り、ヒラメと同様の結果であった。また、腎臓及び腹腔浸出細胞から分離した白血球について LXs産生能を検討した。腎臓及び腹腔浸出細胞から分離した白血球は  $\text{Ca}^{2+}$ イオノフォアの刺激有無にかかわらず、どの魚種においても検出されなかった (Table-1)。

#### 2. 細菌感染によるヒラメ血中白血球のリポキシン産生

in vitro 系において LXsが検出されなかったヒラメを用いて、in vivo 系において LXsが産生されるかどうかを検討した。ヒラメに*E. tarda* ( $4.5 \times 10^3$  CFU/ml)を腹腔内注射して経時的に末梢血を取り出し、赤血球に対する白血球の割合を求め、各時における末梢血の LXs産生能を検討した。Fig.6 より、白血球の割合は24時間後に約 5.0%と最大になり、それ以降で白血球は減少したが、120 時間後に約1.25%まで増加した。末梢血中の LXs産生能を経時的に測定したが(結果は示さず)、どの時間帯においても検出されなかった。また、 $\text{Ca}^{2+}$ イオノフォアで各時全血を刺激しても LXsは検出されなかった。

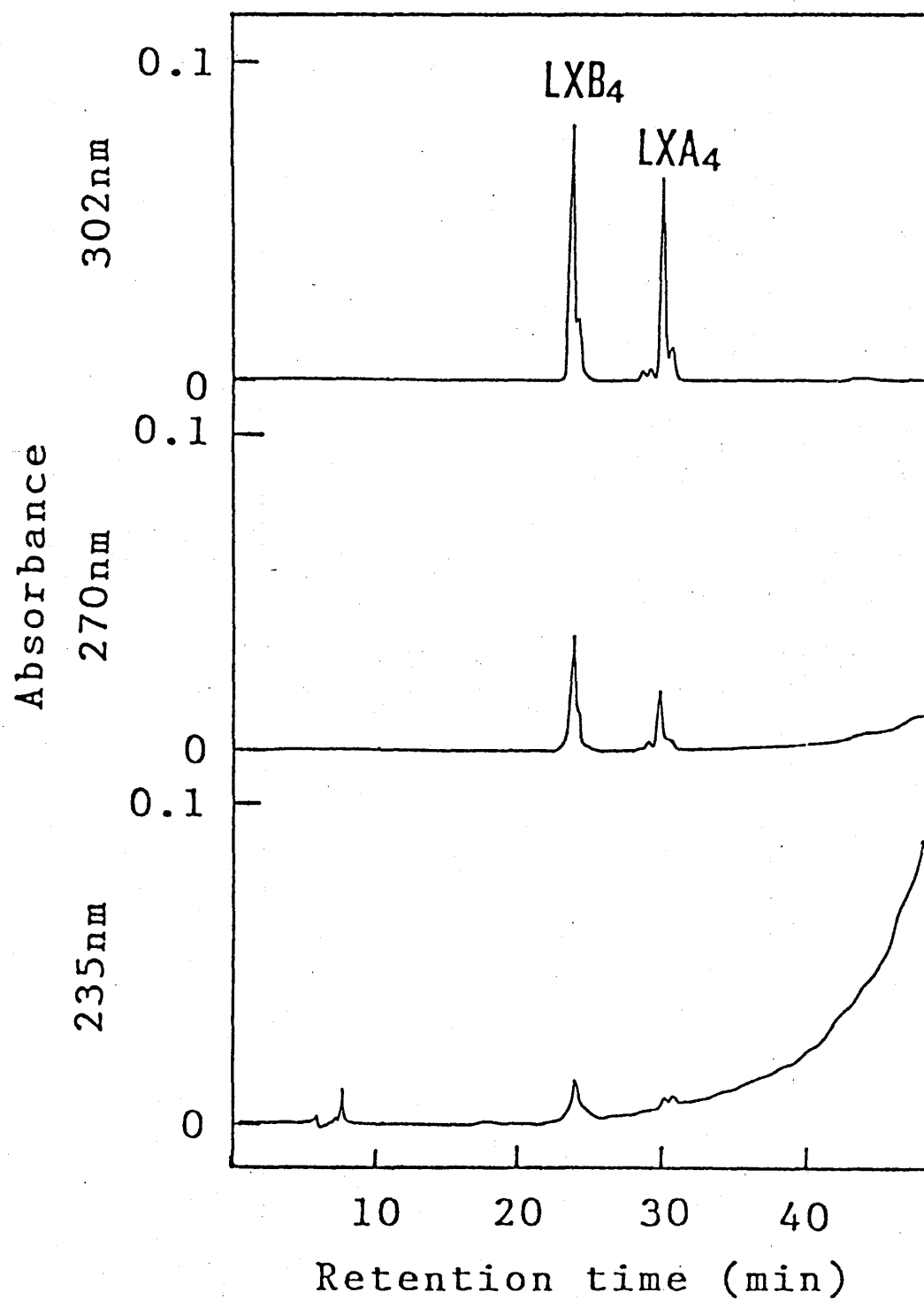


Fig. 1. HPLC chromatogram of authentic LXA<sub>4</sub> and LXB<sub>4</sub>.

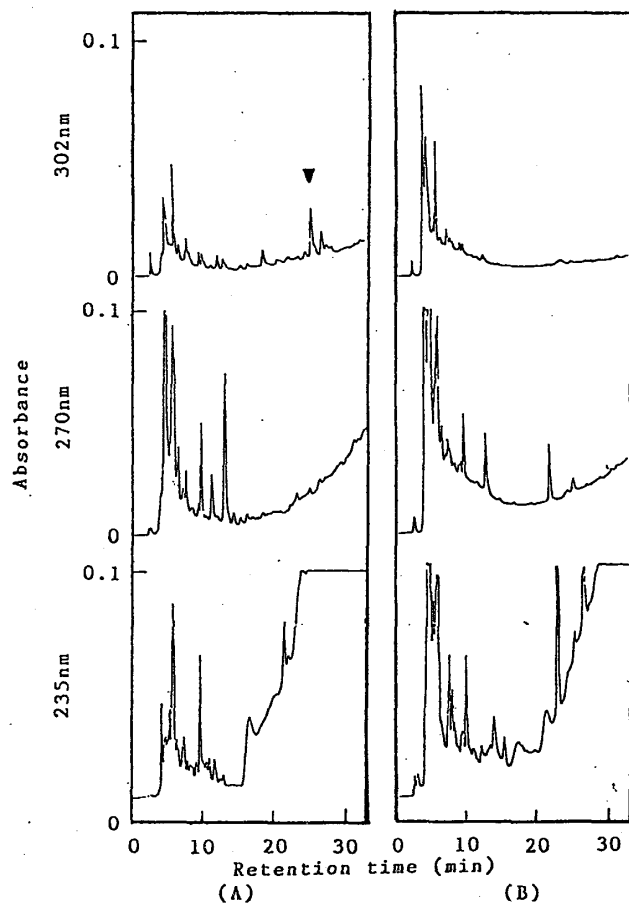


Fig. 2. Lipoxigenase products from leukocytes isolated from peripheral blood of rainbow trout challenged with A23187 (A) and non-challenged with A23187 (B).

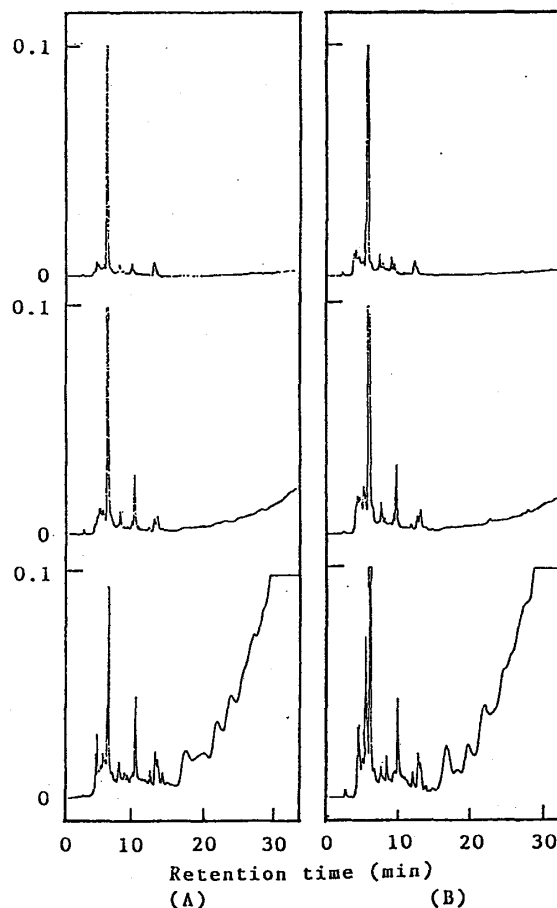


Fig. 3. Lipoxigenase products from leukocytes isolated from peripheral blood of yellow tail challenged with A23187 (A) and non-challenged with A23187 (B).

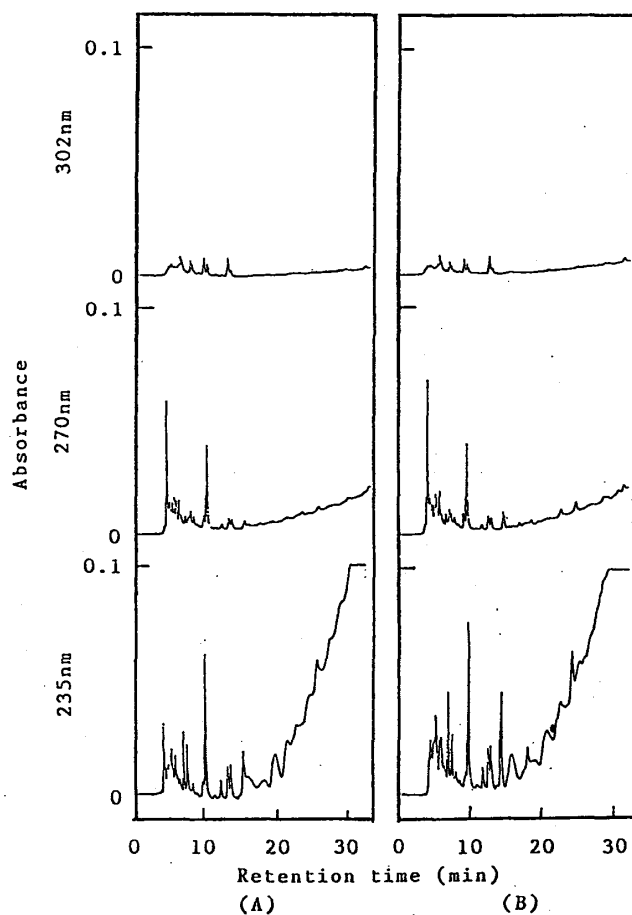


Fig. 4. Lipoxigenase products from leukocytes isolated from peripheral blood of flounder challenged with A23187 (A) and non-challenged with A23187 (B).

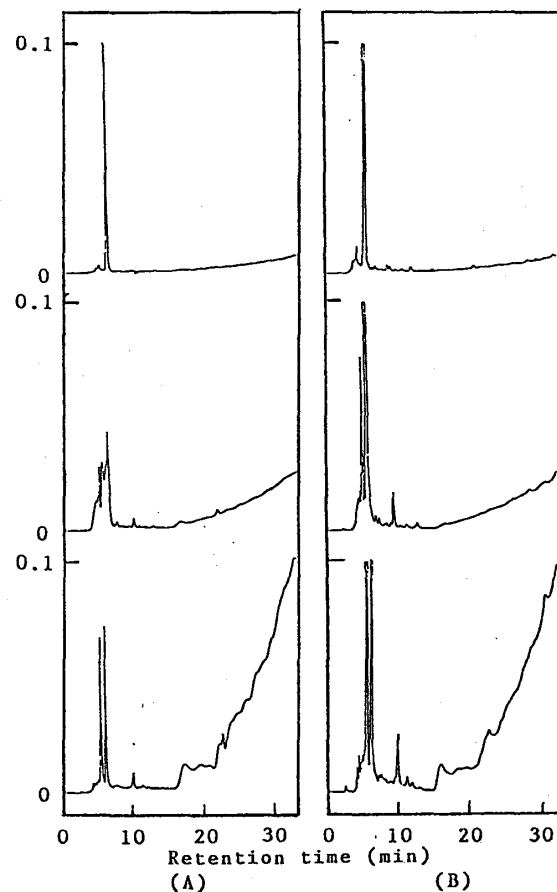


Fig. 5. Lipoxigenase products from leukocytes isolated from peripheral blood of red sea bream challenged with A23187 (A) and non-challenged with A23187 (B).

Table 1. Detection of LXs from leukocytes challenged with A23187,  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore.

Fish	Leukocytes		
	Kidney	Peripheral blood	Peritoneal exudate cell
Rainbow trout	-	+	-
Flounder	-	-	-
Yellow tail	-	-	-
Red sea bream	-	-	-

+ , detected; - , not detected.

## 考 察

白血球は存在場所、刺激物の違い、刺激物の質的、量的違いなどにより産生物質が異なることが知られている。魚類では一般に腎臓は造血器官であり、未熟な白血球が存在している。末梢血は造血器官からの白血球が流れ、血液中を循環する成熟型の白血球である。そして、必要に応じて、各臓器に移動し、定着してその臓器特有の働きを持つ白血球になる。腹腔浸出細胞は異物などの刺激により、末梢血中の白血球がプライミングをうけて活性化され、腹腔に浸出してくる成熟型の白血球である。このように腎臓、末梢血、腹腔浸出細胞由来の白血球はそれぞれ性質の異なる白血球であることが考えられている。

ニジマス腎臓由来のマクロファージを 2, 3日培養したものを  $\text{Ca}^{2+}$ イオノフォアで刺激すると、主に LXsを産生するが、培養せずにすぐに使用したマクロファージはそれよりも LXs産生量は少なかった<sup>15)</sup>。また、末梢血から分離した白血球においては LXsを産生するが、マクロファージと比べ、その産生量が少なかったことが報告されている<sup>16)</sup>。これらの報告から、ニジマスマクロファージは白血球のなかで最も多く LXs産生を行い、しかも産生される量はマクロファージの成熟度合が高くなるほど多くなることがわかる。なお本実験で、LXsがニジマス末梢血から分離した白血球にのみ検出され、腎臓及び腹腔浸出細胞から分離した白血球では検出されなかった。また、腎臓から分離した白血球は 15-リポキシゲナーゼが存在していることも明らかになった。このことと腎臓中の

白血球が末梢血を経て、腹腔内に移行することから、ニジマスの腎臓から分離した白血球は未分化な白血球が多いため、LXsが検出できなかったものと推察される。しかし、腹腔浸出細胞から分離した白血球は腎臓及び末梢血から分離した白血球に比べ、成熟度合が高く、マクロファージが多く存在している。それにもかかわらず、 $\text{Ca}^{2+}$ イオノフォアの刺激によりLXsは検出できなかった。このことから、異物へ集まってきた白血球（腹腔浸出細胞）はLXsを産生しないか、あるいは産生しても末梢血の白血球に比べて、極微量であることが推察される。つまり、異物へ集まってきた白血球にとってLXsは生理的な意味をもたない可能性が高いことが推察される。

また、炎症が起こると、血管内皮細胞が拡張し、血液中の白血球が血管から漏出する。そしてそれと同時に、腹腔内接種したカゼインが血液中に流入し、末梢血の白血球により貪食される。このように腹腔浸出細胞および末梢血の白血球は異物であるカゼインを貪食するが、LXs産生が認められたのは末梢血の白血球であった。このことからLXsが貪食作用に直接、関与するとは考えにくい。

しかし、白血球はカゼインによるプライミングを受けていたり、刺激物として $\text{Ca}^{2+}$ イオノフォアを用いた *in vitro*系での実験であったため、*in vivo*系においても同様のことが起こっているとは限らない。また、*in vitro*系においても、プライミングの種類の違いや刺激物の違いなどで、産生物質が異なることもある。

一般に、LXsの生理作用は*in vitro*系において微小循環系を刺激する。例えば、 $\text{LXA}_4$ はハムスターの頬囊<sup>17)</sup>やラットの腎臓血液動態<sup>18)</sup>において迅速に細動脈の拡張を誘発する。また、ブタ新生児においては $\text{LXA}_4$ と $\text{LXB}_4$ はともに脳細動脈を拡張する<sup>19)</sup>。現在のところ、LXsはシステニル基をもったロイコトリエンよりも有力な血管拡張剤であることが知られている<sup>20)</sup>。ラットの腎臓においては $\text{LXA}_4$ は $\text{LTD}_4$ で誘発される血管収縮を拮抗する。このことから、 $\text{LXA}_4$ は血管収縮剤であるLTsの作用を制御するのではないかと考えられている<sup>21)</sup>。これらのことから、ニジマス末梢血の白血球で認められたLXsは血管内での生理的作用に関与するのではないかと推察される。つまり、腹腔内で炎症が起こると多くの白血球を浸出させるために末梢血の白血球がLXsを産生して血管を拡張させ、白血球の透過性を高めたのではないかと推察した。

*in vitro*系における末梢血白血球は周りの組織、主に血管内皮細胞や血液成分の影響を受けている可能性があるため、*in vivo*系によるLXs産生を検討する必要がある。そこで、*in vitro*系でLXsが検出されなかった魚種のうち、ヒラメにおいてE. tarda感染を行い、経時的にLXs産生を検討した。その結果、感染後、末梢血中の白血球数は24時間後に最大となり、それ以降で白血球は減少し、120時間後に増加している。このことから、感染後24時間頃に好中球が現れ、120時間頃にマクロファージが現れることが示唆される。しかし、このような白血球の動態にもかかわらず、どの時間帯においてもLXsが検出されなかった。このことにより、白血球のLXs産生は魚種間の違いがあることが示唆された。



## 要 約

Ca<sup>2+</sup>イオノフォア(A23187)刺激後のニジマス末梢血内の白血球で LXsは検出されたが、ブリ、マダイ、ヒラメの白血球においては検出されなかった。また LXsはニジマス末梢血内の白血球で検出されたが、腎臓および腹腔浸出細胞の白血球においては検出されなかった。ヒラメの人為魚病細菌感染によっては、LXsは検出されなかった。

## 文 献

- 1) K. C. Nicolaou, J.Y. Ramphal, N. A. Petasis, C. N. Serhan : *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **30**, 1100-1116 (1991).
- 2) 山本尚三, 室田誠逸 : 講座プロスタグランジン **8**, pp.112-123, 東京化学同人.
- 3) B. J. Fitzsimmons, J. Adams, J. F. Evans, Y. Leblanc and J. Rokach : *J. Biol. Chem.*, **260**, 13008-13012 (1985).
- 4) C. N. Serhan, K. C. Nicolaou, S. E. Webber, C. A. Veale, T. J. Puustinen and B. Samuelsson : *J. Biol. Chem.*, **261**, 16340-16345 (1986).
- 5) D. Steinhilber and H. J. Roth : *FEBS Lett.*, **255**, 143-148 (1989).
- 6) C. N. Serhan : *Biochim. Biophys. Acta*, **1004**, 158-168 (1987).
- 7) C. Edenius, J. Haeggstrom and J. A. Lindgren : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **157**, 801-807 (1988).
- 8) B. K. Lam, C. N. Serhan, B. Samuelsson and P. Y. K. Wong : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **144**, 123-131 (1987).
- 9) P. Walstra, J. Verhagen, M. A. Vermeer, J. M. P. Klerks, G. A. Veldink and J. F. G. Vliegenhart : *FEBS Lett.*, **228**, 167-171 (1988).
- 10) S. J. Kim : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **150**, 870-876 (1988).
- 11) C. F. Ng, B. K. Lam, K. A. Pritchard, M. B. Stemerman, P. Hejny and P. Y. K. Wong : *Biochim. Biophys. Acta*, **1004**, 332-336 (1989).
- 12) R. Garrick, S. Y. Shen, S. Ogunc and P. Y. K. Wong : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **162**, 626-631 (1989).
- 13) C. N. Serhan, U. Hirsch, J. Palmblad and B. Samuelsson : *FEBS Lett.*, **217**, 242-246 (1987).
- 14) C. N. Serhan and K. A. Sheppard : *J. Clin. Invest.*, **85**, 772-776 (1990).

- 15) T. R. Pettitt, A. F. Rowley, S. E. Barrow, A. I. Mallet and C. J. Secomes : J. Biol. Chem., **266**, 8720-8726 (1991).
- 16) A. F. Rowley, T. R. Pettitt, C. J. Secomes, G. J. E. Sharp, S. E. Barrow and A. I. Mallet : "Advances in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research", Raven Press, NY, **21B**, pp.557-560 (1991).
- 17) U. Ramstedt, C. N. Serhan, K. C. Nicolaou, S. E. Webber, H. Wigzell and B. Samuelsson : J. Immunol., **138**, 266-270 (1987).
- 18) M. S. Shearman, K. Naor, K. Sekiguchi, A. Kishimoto and Nishizuka : FEBS Lett., **243**, 177-182 (1989).
- 19) S. E. Dahlen, J. Raud and C. N. Serhan : Acta Physiol. Scand., **130**, 643-648 (1987).
- 20) K. F. badr, C. N. Serhan, K. C. Nicolau and B. Samuelsson : Biochem. Biophys. Res. Commun., **145**, 408-414 (1987).
- 21) D. W. Busija, W. Armstead, C. W. Leffler and R. Mirrom : Amer. J. Physiol., **25**, 468-471 (1989).